Université catholique de Louvain
Faculté des Sciences
Earth and Life Institute

Université libre de Bruxelles
Faculté des Sciences
Dépt. de Biologie des Organismes

Towards a better understanding of copper tolerance mechanisms in the model plant species *Arabidopsis thaliana*

Thèse présentée par Hélène Lequeux en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences.

Promoteurs	Prof. Nathalie Verbruggen (ULB)
	Prof. Stanley Lutts (UCL)
Membres du Jury	Prof. Xavier Draye
	Prof. Mondher El Jaziri
	Dr. Marc Hanikenne
	Prof. Pierre Meerts
	Prof. Hans Van Dyck (Président)

Décembre 2011

Contents

Résumé ix

Summary xi

Abbreviations xiii

I. Introduction 1

1. General points on copper 3
- 1.1. Biochemical and physical properties of copper 3
- 1.2. Natural occurrence of Cu in the environment 4
- 1.3. The history of Cu homeostasis 6

2. Overview of the Cu homeostasis mechanisms in bacteria, yeasts and humans 8
- 2.1. Cu homeostasis in bacteria 8
- 2.2. Cu trafficking in yeasts 9
  - 2.2.1. Cu uptake into the cell 9
  - 2.2.2. Cu distribution inside the cell 10
  - 2.2.3. Regulation of intracellular Cu levels 12
- 2.3. Cu metabolism and disorder in humans 13

3. Cu homeostasis mechanisms in plants 15
- 3.1. Roles of Cu in plants 15
  - 3.1.1. Plastocyanin 16
  - 3.1.2. Cytochrome c oxidase 18
  - 3.1.3. Cu/Zn SOD 18
  - 3.1.4. Ethylene receptors 19
  - 3.1.5. Multi-copper oxidases 20
  - 3.1.6. Phytocyanins 21
  - 3.1.7. Amine oxidases 21
  - 3.1.8. Polyphenol oxidases 21
  - 3.1.9. Molybdopterin 21
- 3.2. Typical levels of Cu in plants 23
- 3.3. Uptake and distribution of Cu at the whole plant level 24
  - 3.3.1. Cu bioavailability in soils 24
  - 3.3.2. Uptake of Cu by roots 26
  - 3.3.3. Root-to-shoot translocation of Cu 30
  - 3.3.4. Redistribution of Cu 34
- 3.4. Cu trafficking inside the cell 35
  - 3.4.1. Cu transporters 35

3.4.2. Cu chaperones 40
3.5. Cu homeostasis in land plants vs. in green algae 42
3.6. Regulation of Cu homeostasis in plants 43
3.6.1. Sensing and signaling changes in Cu status 43
3.6.2. Regulation of Cu transporters and Cu chaperones 44
3.6.3. Regulation of cuproenzymes via micro-RNAs 46
3.6.4. Role of the transcription factor SPL7 47
3.6.5. Interconnection between Cu homeostasis and the circadian clock 49
4. Cu toxicity in plants: symptoms and resistance mechanisms 50
4.1. Origins and occurrence of Cu-contaminated soils 50
4.2. Symptoms of Cu toxicity 52
4.2.1. Visual symptoms of Cu toxicity 52
4.2.2. Effects of Cu toxicity on physiology and biochemistry 52
4.2.3. Effects of Cu toxicity on gene expression 53
4.3. Mechanisms of Cu tolerance 54
4.3.1. Reduction of Cu uptake 54
4.3.2. Stimulation of Cu efflux 55
4.3.3. Intracellular chelation of Cu 56
4.3.4. Intracellular sequestration of Cu 57
4.3.5. Role of ROS-scavenging enzymes 58
4.4. The case of Cu-tolerant plants 59
II. Objectives 63
III. Experimental part 69
Chapter I: Morphological and physiological responses of *A. thaliana* to Cu excess* 71
I.1. Results 71
I.1.1. Effect of Cu^{2+} excess on biomass production and mineral concentration 71
I.1.2. Impact of Cu^{2+} excess on the root system architecture 75
I.1.3. Changes in the hormonal balance, cell cycle and cell viability in Cu^{2+}-treated root tips 76
I.1.4. Local toxicity of Cu^{2+} in roots 80
I.1.5. Accumulation of lignin in Cu^{2+}-treated roots 82
I.2. Discussion 82
I.2.1. Effect of Cu^{2+} excess on plant growth and mineral status 82
I.2.2. Root system remodeling during Cu^{2+} excess 84
I.2.3. Influence of Cu^{2+} excess on cell viability, hormonal status, cell divisions and lignin deposition within root tips. 85

Chapter II: Genetic approach: towards the discovery of new genetic components involved in Cu tolerance **91**
II.A. Mutant screening: identification of mutants altered in their response to Cu^{2+} excess 91
II.A.1. Results 91
II.A.2. Discussion 97
II.B. Phenotypic characterization of the *cop29* mutant 101
II.B.1. Results 101
II.B.2. Discussion 121
II.C. Map-based cloning and identification of the mutation 131
II.C.1. Results 131
II.C.2. Discussion 158
II.D. Characterization of the *COP29* gene/protein 165
II.D.1. Results 165
II.D.2. Discussion 172

IV. General discussion **177**

V. Perspectives **183**

VI. Material and methods **187**

1. Seed material **189**

2. Plant culture **190**
2.1. Hydroponic culture 190
2.2. *In vitro* culture 191

3. Mineral analysis **192**
3.1. Mineral analysis of hydroponically-grown plants 192
3.2. Mineral analysis of *in vitro*-grown seedlings 193

4. Ethylene measurements **193**

5. Hormone extraction and analysis **194**

6. Histochemical staining **196**
6.1. β-glucuronidase activity 196
6.2. Cell viability assay 197
6.3. Lignin staining 197

7. DNA manipulations **197**
7.1. DNA isolation 197
7.2. Polymerase chain reaction (PCR) 198
7.2.1. PCR with a Taq polymerase 198
7.2.2. PCR with a Pfu polymerase 198
7.2.3. Long PCR 198

7.2.4. Reverse Transcriptase (RT)-PCR 199
7.3. DNA sequencing 200
8. RNA manipulations 200
8.1. RNA isolation 200
8.2. cDNA synthesis 200
8.3. Northern blot analysis 200
8.3.1. Synthesis of a specific RNA probe 200
8.3.2. Northern blotting 201
9. Detection of molecular markers 202
9.1. List of molecular markers 202
9.2. Methods of detection 202
9.2.1. Detection of SSLP, InDels and CAPS makers 202
9.2.2. qPCR and melting curves for the SNP marker detection 202
10. Transcriptomic analysis 205
10.1. Plant material and RNA extraction 205
10.2. Genome-wide expression 205
10.3. Data analysis 206
11. Illumina sequencing for SHOREmap 207
11.1. DNA pool isolation 207
11.2. Illumina library preparation 207
11.3. Cluster generation and sequencing 208
11.4. Read alignments 209
12. Subcellular localization of COP29 in tobacco protoplasts 209
12.1. Bacterial strains and culture media 209
12.2. Bacterial transformation 209
12.3. Bacterial plasmid DNA isolation 210
12.4. Plasmids 210
12.5. Genetic constructs 211
12.6. Isolation of tobacco protoplasts 212
12.7. Protoplasts transformation and confocal microscopy 213
13. Database search and bioinformatics 214
13.1. The Arabidopsis Information Resource 214
13.2. Analysis of gene expression patterns 214
13.3. Analysis of protein sequences 215
14. Statistical analysis 215
References 217
Appendixes 253

Résumé

Le cuivre (Cu) est un nutriment essentiel à la vie des organismes mais aussi, lorsqu'il est présent en excès, un constituant toxique de la cellule. Pour faire face à des concentrations élevées en Cu dans l'environnement, les plantes ont développé des mécanismes complexes de tolérance au Cu. L'objectif de ce travail est d'apporter une contribution à la compréhension de ces mécanismes en utilisant la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Dans un premier temps, nous avons montré que l'excès de Cu^{2+} entraîne une réorganisation de l'architecture du système racinaire caractérisée par une inhibition de la croissance de la racine primaire et l'augmentation de la densité de racines latérales. Nous avons mis en évidence plusieurs processus métaboliques associés à cette réorganisation, tels que des changements dans l'homéostasie minérale, le statut hormonal et la production de lignine. Une approche de génétique classique a ensuite été entreprise afin de mieux comprendre les composants moléculaires impliqués dans cette réponse. Un criblage de mutants a été effectué sur excès de Cu^{2+} dans le but d'isoler des mutants présentant un phénotype racinaire altéré par le Cu^{2+}. Un mutant sensible au Cu^{2+} (appelé *cop29*) a été sélectionné en raison de sa forte inhibition de croissance racinaire sur excès de Cu^{2+}. Le clonage positionnel du mutant, combiné avec des approches génomiques, a permis d'identifier le gène *At3g14190* comme étant le gène muté responsable du phénotype de *cop29*. Ce gène encode une protéine de fonction encore inconnue. La caractérisation phénotypique de *cop29* a révélé que le mutant est également sensible à l'excès de Zn^{2+}, Mn^{2+} et Na^{+}. De plus, en présence d'un excès de Cu^{2+} ou de Na^{+}, le mutant présente des concentrations en K^{+} significativement plus faibles que le type sauvage. La caractérisation du gène/protéine COP29 a débuté et a permis de mettre en avant, grâce à l'utilisation des banques de données génomiques et protéomiques, que la protéine COP29 pourrait jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. En accord avec cette hypothèse, un homologue de COP29 a été récemment caractérisé chez le riz et permet de maintenir l'activité méristématique en conditions de stress. Les perspectives consisteront à confirmer un rôle similaire de la protéine COP29 chez *Arabidopsis*.

Summary

Copper (Cu) is an essential micronutrient for all living organisms but it becomes highly toxic when present in excess. To cope with high levels of Cu supply, plants have evolved tightly regulated tolerance networks. This project aims to contribute to the understanding of Cu tolerance mechanisms by using the model plant species *Arabidopsis thaliana*. First, we showed that Cu^{2+} excess is responsible for a reorganization of the root system architecture (RSA) characterized by a primary root growth inhibition and an increase in the lateral root density. Several metabolic processes are associated with this RSA remodeling, including changes in the mineral homeostasis, hormonal status and lignin deposition. A classical genetic approach was then undertaken to tackle the components of this response. In a screen for mutants altered in their response to Cu^{2+} excess, one Cu^{2+}-sensitive mutant (named *cop29*) was selected because it exhibited a severe root growth inhibition upon Cu^{2+} excess. Through a map-based cloning combined with genomic approaches, we identified the *At3g14190* gene as the mutated gene responsible for the *cop29* phenotype. This gene encodes a protein that has never been characterized before. The *cop29* phenotypic characterization revealed that the mutant is also sensitive to Zn^{2+}, Mn^{2+}, and Na^{+} excess. We also noticed significant lower K^{+} concentrations in mutant tissues compared to WT upon Cu^{2+} or Na^{+} excess. We started the characterization of the COP29 gene/protein and underlined, by using genomic and proteomic databases, that the COP29 protein could have a role as a regulator of the cell cycle. In agreement with this hypothesis, a homologue of the COP29 protein has been recently characterized in rice and maintains meristematic activity under stress conditions. Perspectives will involve additional experiments to confirm a similar role of the COP29 protein in *Arabidopsis*.